Arnaldoa 19(1): 65 - 72, 2012 ISSN: 1815 - 8242

Variación del contenido de peroxidasas solubles en plantas de *Medicago sativa* L. "alfalfa" sometidas a diferentes concentraciones de plomo

Variation of the content of soluble peroxidases in *Medicago* sativa L. "alfalfa" subjected to different concentrations of lead

Irene Consuelo Julca Chávez, José Luis Castillo Zavala, Jorge Elías Castro Silupú, Mercedes Elizabeth Chaman Medina

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo,Av. Juan Pablo II s/n. Trujillo, PERÚ, *irene_julca@hotmail.com*

Resumen

Las peroxidasas (POXs) se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas donde participan en diversos procesos fisiológicos. Entre ellos, accionar mecanismos de respuesta a diferentes situaciones de estrés, como el exceso de metales pesados en el suelo. En este trabajo se determinó la variación de la actividad de peroxidasas solubles en plantas de *Medicago sativa* L. sometidas a diferentes concentraciones de plomo. El material biológico estuvo constituido por plántulas de "alfalfa", las que fueron cultivadas en un medio hidropónico con diferentes concentraciones de plomo bajo condiciones controladas de invernadero. A los 10 y 20 días se analizó la actividad de peroxidasas solubles en hojas y raíces. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) en la actividad de estas peroxidasas entre tratamientos. En hojas, alcanzó su valor más alto (2,0113 µmoles/minuto) a la concentración de 200 ppm a los 10 días. En raíces, se observó el valor más alto (3,9847 µmoles/minuto) a la concentración de 100 ppm de plomo a los 20 días. Este comportamiento podría estar relacionado con la capacidad de respuesta de las plántulas de alfalfa al estrés por metales pesados. Así, la actividad de peroxidasas solubles en "alfalfa" aumentó con el tratamiento creciente de las concentraciones de plomo, y este incremento varió con el órgano analizado y el tiempo de exposición.

Palabras clave: Peroxidasas, *Medicago sativa*, plomo.

Abstract

Peroxidases (POXs) are widely distributed in plants where they participate in various physiological processes. Among them, trigger response mechanisms to different stress, such as excessive heavy metals in soil. This study determined the variation of soluble peroxidases activity in plants of *Medicago sativa* L. subjected to different concentrations of lead. The biological material consisted of seedlings of "alfalfa", which were grown in a hydroponic medium with different concentrations of lead under controlled greenhouse conditions. To 10 and 20 days was analyzed soluble peroxidases activity in leaves and roots. The results showed significant differences ($p <0.05$) in the activity of these peroxidases between treatments. In leaves, reached its highest value (2.0113 moles / minute) at a concentration of lead 200 ppm to 10 days. In roots, we observed the highest value (3.9847 moles / minute) at a concentration of lead 100 ppm to 20 days. This behavior could be related to the responsiveness of alfalfa seedlings to stress by heavy metals. We conclude that the activity of soluble peroxidases "alfalfa" increased with increasing treatment of lead concentrations, and this increase varied with the organ analyzed and the exposure time.

Key words: Peroxidases, *Medicago sativa*, lead.

Introducción

Muchos metales como el Mg, Fe, Zn, Cu son esenciales para el desarrollo normal de la planta, ya que son compuestos estructurales y catalíticos de proteínas y enzimas. Sin embargo, la actividad humana libera al suelo, grandes cantidades de éstos y otros metales no esenciales, como el Al, Cd, Hg, Ni o Pb que pueden resultar tóxicos para las plantas (Azcón & Talón, 2000; Clemens, 2001).

Una de las principales actividades humanas que aumenta la cantidad de metales en el suelo, es la minería. El Perú es un país minero cuya participación en la producción mundial destaca como productor de primer nivel en zinc, plata y estaño pero en menor escala de plomo, cobre y oro. Aunque resulta difícil hacer una generalización de los problemas ambientales para las diversas regiones mineras del Perú; es posible señalar entre los principales impactos a los efluentes ácidos con elevados niveles de metales pesados, que son descargados sin tratamiento en los cursos de agua, muchos de los cuales son utilizados para el riego de grandes extensiones de suelos agrícolas (Nuñez, 2005; Dammert & Molinelli, 2007).

Los suelos que quedan tras una explotación minera contienen todo tipo de materiales residuales, escombros estériles, entre otros, lo que representa graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal. Los metales tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos (Puga *et al.*, 2006). Excesivas concentraciones de metales pesados en el suelo, podrían acumularse en los tejidos vegetales en cantidades no permisibles, afectando la producción de los cultivos e impactando en la calidad de los alimentos; ya que estos metales se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de plantas por animales y estos a su vez por humanos (Vázquez *et al.*, 2001; Armas & Armas, 2002).

Los metales pesados más comunes en sitios contaminados son cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), plomo (Pb), mercurio (Hg), niquel (Ni) y zinc (Zn); de los cuales el mercurio y el plomo son los contaminantes de mayor riesgo, que incluso atentan contra la salud humana (Nuñez, 2005).

El plomo, es un elemento metálico, denso, de color gris azulado, relativamente abundante que se encuentra en el aire, agua, suelo, plantas y animales. Este mineral se libera en forma natural por erosión del suelo, desgaste de los depósitos minerales de plomo y emanaciones volcánicas. El plomo atmosférico se convierte en una amenaza puesto que una vez en el medio, puede llegar a otras regiones por la acción del viento y depositarse en diversos sustratos como el suelo, el agua y la vegetación (Mellanby, 1977; Armas & Armas, 2002).

Se ha encontrado que el plomo produce un retardo en la degradación de la materia orgánica, y se ha observado que las plantas que crecen en suelos contaminados por este elemento tienden a concentrarlo en su sistema radicular (Albert, 1997). Mientras que, en el hombre, el plomo al ser ingerido a través de los alimentos o por vías respiratorias se acumula en los riñones, hígado y huesos, produce aberraciones cromosómicas alterando especialmente los espermatozoides (Armas & Armas, 2002), además puede actuar como un inhibidor enzimático y alterar el metabolismo celular (Albert, 1997; Vázquez *et al.*, 2001).

En las plantas algunos metales pesados pueden ser requeridos sólo en cantidades trazas, sin embargo, ellos son tóxicos cuando su concentración es mayor (Ratkevicius&Moenne, 2002), promoviendo, en las plantas, un aumento de las especies reactivas del oxígeno (H2O2 - peróxido de hidrógeno, O2 - anión superóxido, OH - hidroxilo), capaces de producir un estrés oxidativo. Estas especies reactivas del oxígeno, en forma natural, son biológicamente producidas durante la respiración mitocondrial así como por la fotosíntesis (Martínez, 2003). Las plantas para contrarrestar el estrés oxidativo producen defensas antioxidantes, que pueden ser: No enzimáticas, como Ácido Ascórbico (Vitamina C), ß-caroteno, Glutatión, α-tocoferol (Vitamina E); y Enzimáticas, como peroxidasas (Ascorbatoperoxidasa), Catalasa, Glutatión reductasa, Superóxidodismutasa; encargadas de mantener las especies reactivas del oxígeno en niveles no perjudiciales (Chai *et al.*, 2005; Naya, 2007).

Las peroxidasas (POXs) son un tipo de enzimas muy extendidas en toda la escala filogenética. Catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido (Donald &Cipollini,1998;Iturbe,1996). Las POXs están ampliamente distribuidas en las plantas. Éstas presentan múltiples formas isoenzimáticas que difieren tanto en la secuencia de sus aminoácidos como en sus propiedades químicas. Los resultados de numerosos estudios

realizados con diferentes especies, determinaron que las POXs están involucradas en procesos fisiológicos relevantes de las plantas superiores tales como control del crecimiento,la biosíntesis de lignina, catabolismo de auxinas, resistencia a patógenos, como así también en diversos mecanismos de respuesta que éstas presentan a diferentes situaciones de estrés, como exceso de metales en el suelo (Donald &Cipollini,1998; Truelove *et al.*, 2003; Baquero *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2008).

Medicago sativa "alfalfa" es una leguminosa, cuyo ciclo vital varía entre cinco y doce años, dependiendo de la variedad, así como de los factores medioambientales en donde se desarrolla. El tallo puede llegar a medir hasta un metro de altura, ya que su raíz puede introducirse a más de 9 m de profundidad, a fin de alcanzar cualquier reserva de nutrientes y soportar sequías extremas; adaptándose muy bien a condiciones climáticas variadas (Villegas *et al.,* 2004; Pagliaricci & Pereyra, 2006).

El cultivo de esta planta es importante debido a su capacidad para fijar nitrógeno en el suelo, por lo que se la utiliza como acondicionadora del suelo, permitiendo el aumento de la productividad de cultivos posteriores. Además, es muy usada como planta forrajera y sus flores son también un alimento excelente para abejas melíferas (Villegas *et al.*, 2004; Pagliaricci& Pereyra, 2006). Así también, el hombre utiliza los germinados de "alfalfa" como alimento, debido a su alta calidad nutricional, ya que contienen proteínas de gran calidad y biodisponibilidad, carbohidratos, grasas poliinsaturadas, fibra, gran cantidad de vitamina K, C, A, D, E, B y carotenos; minerales, como el potasio, magnesio, calcio, hierro, azufre, cobalto y otros más; además es una fuente muy buena de clorofila y es muy rica en un bioflavonoide, llamado rutina (Pagliaricci & Pereyra, 2006).

Diversas investigaciones revelan que la actividad de las peroxidasas incrementa por efecto de los metales pesados en el medio. Así, se ha reportado que en plantas de *Cucurbita pepo* L., *Dalia* sp., *Tagetes erecta* L y *Cosmos bipinnatus*, así como en el alga *Enteromorpha compressa* tratadas con metales pesados, la actividad de peroxidasas incrementa en hojas y raíces (Tahlil *et al.,* 1999;Ratkevicius & Moenne, 2002; Rodríguez *et al.,* 2006).Sin embargo, no se han reportado muchas investigaciones en relación a la actividad de peroxidasas de las plantas expuestas a concentraciones elevadas de plomo. Basado en ello, el interés de este trabajo es determinar la variación de la actividad de peroxidasas solubles en plantas de *Medicago sativa* L. sometidas a diferentes concentraciones de plomo.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Plantas de *Medicago sativa* L. "alfalfa", obtenidas a partir de semillas certificadas.

Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2 %, enjuagadas con agua destilada y colocadas en un sistema de germinación; de tal manera que al germinar las semillas, sus raicillas crecieran verticalmente a fin de facilitar el transplante a la solución de plomo respectiva.

Tratamiento de las Plántulas con soluciones de Plomo

Plántulas de alfalfa de 7 días de edad se trasplantaron a recipientes de vidrio de 200 mL cubiertos con papel aluminio. A estos recipientes se agregó el medio de cultivo preparado con solución hidropónica a la que se adicionó nitrato de plomo para conseguir las concentraciones de Pb: 0, 50, 100 y 200 ppm. Para la oxigenación del medio, se utilizó un aireador mecánico y para evitar la sedimentación de los nutrientes cada botella fue agitada manualmente durante dos minutos por día. Las plantas crecieron en el Invernadero del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo, a una temperatura promedio de 25 ± 2ºC y humedad relativa de 75 ± 2%.

Para establecer los diferentes tratamientos se utilizó un diseño completamente aleatorio con tres repeticiones, formándose 8 grupos homogéneos, los cuales fueron tratados con la respectiva solución de plomo, por 10 y 20 días.

Determinación de la Actividad de Peroxidasas Solubles

La actividad de peroxidasas solubles fue determinada en raíces y hojas de plantas de 10 y 20 días de edad.

Se utilizó 1 g de tejido fresco, el cual se trituró en un mortero de porcelana en frío a una temperatura de 4 ºC, utilizando como buffer de extracción 1 ml de fosfato de sodio 50 mM pH 7. El extracto obtenido fue filtrado a través de cuatro capas de gasa y centrifugado a 10000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó para medir la actividad de peroxidasas solubles.

La actividad de las peroxidasas solubles se medió utilizando o-fenilendiamina (o-PDA) 5 mM como sustrato, en presencia de peróxido de hidrógeno 0,002 % y buffer citrato 0,1 M pH 4,5. Luego se determinó la actividad de las peroxidasas solubles midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Finalmente, la actividad de peroxidasas solubles se expresó en µmoles de o – PDA oxidado / minuto.

Análisis Estadístico de Datos

Una vez obtenidos los resultados se ordenaron en tablas y se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba tukey HSD utilizando el software Statgraphics Plus.

Resultados

Plantas de *Medicago sativa* L. "alfalfa" expuestas a diferentes concentraciones de Pb, mostraron incremento de la actividad de peroxidasas solubles ($p<0,05$), encontrando cambios significativos entre los tiempos ($p<0,05$); y diferente comportamiento en hojas y en raíces.

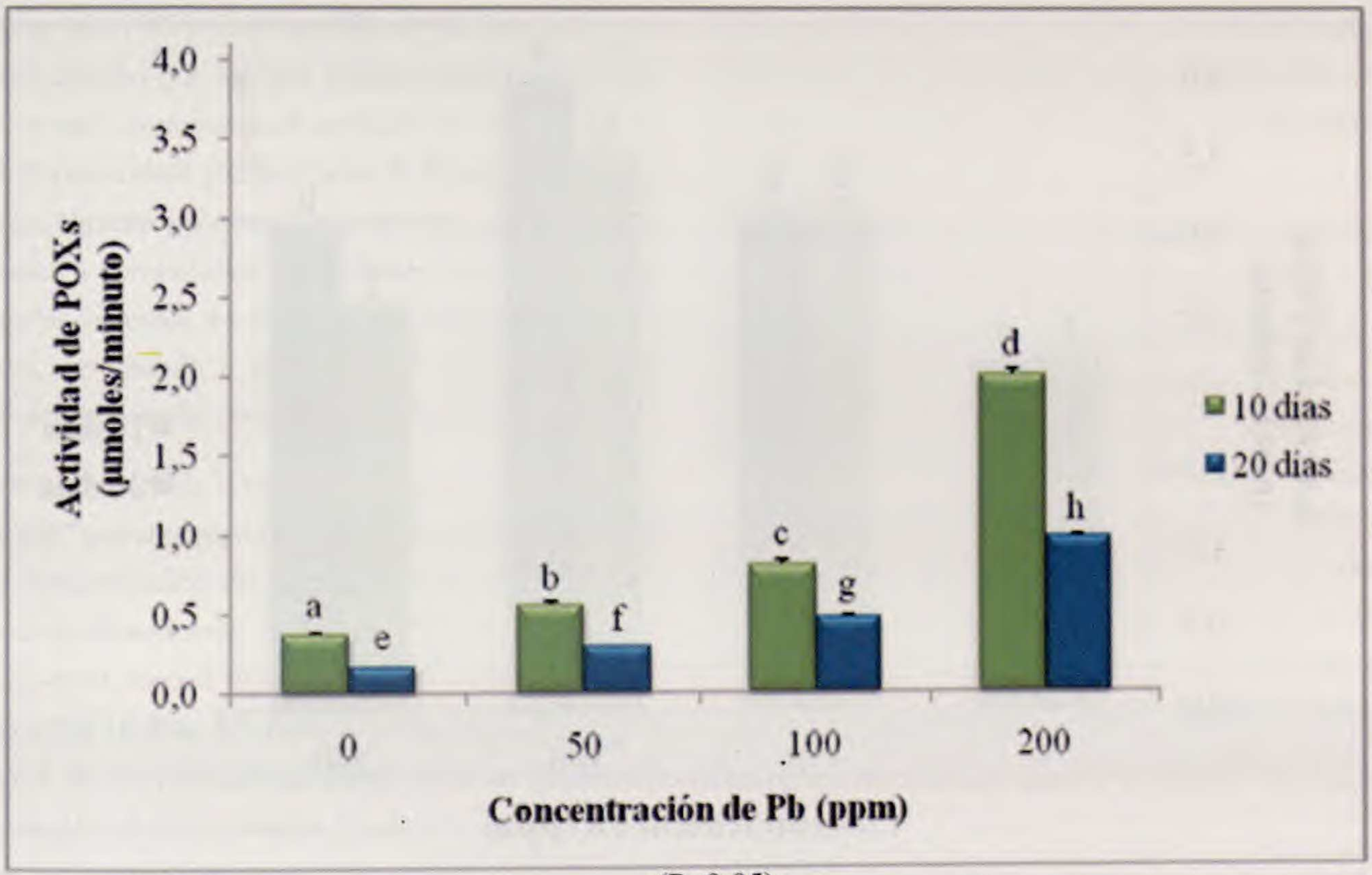
Al comparar los tratamientos de plomo en las hojas, se puede observar (Fig. 1 y 2) que la actividad de peroxidasas solubles incrementa significativamente con la concentración de plomo y disminuye con el tiempo, encontrando el valor más bajo (0,1791 µmoles / minuto) a la concentración de 0 ppm a los 20 días (control) y el valor más alto (2,0113 µmoles / minuto) a la concentración de 200 ppm y a los 10 días, que viene a ser 429,7% mayor que el control. Sin embargo, el mayor incremento se dio a la concentración de 200 ppm a los 20 días, ya que es 448,2% mayor que su control (0.ppm a los 20 días). Existiendo diferencias significativas entre todos los tratamientos, según lo demuestra la prueba Tukey HSD aplicada ($p < 0.05$).

La actividad de peroxidasas solubles en raíces de "alfalfa" (Fig. 3 y 4) incrementa con la concentración de plomo hasta las 100 ppm y a partir de esta concentración, disminuye. Así mismo, se puede apreciar que la actividad de peroxidasas solubles fue similar a los 10 y 20 días, para la concentración de 0 y 50 ppm de plomo; mientras que a las concentraciones de 100 y 200 ppm de plomo, la actividad de peroxidasas solubles aumentó a los 20 días. Encontrando el valor más alto (3,9847 µmoles / minuto) a la concentración de 100 ppm de plomo y a los 20 días, que viene a ser 81,2% mayor que su control. Por el método de comparación múltiple Tukey HSD ($p < 0.05$), se identificaron 5 grupos homogéneos.

Discusión

Al evaluar la actividad de peroxidasas solubles en hojas y raíces de *Medicago sativa* L. "alfalfa" sometidas a diferentes concentraciones de plomo por 10 y 20 días, se observó un aumento de la actividad de estas enzimas.

El incremento de la actividad de peroxidasas encontrado en las hojas de "alfalfa" (Fig. 1 y 2), puede deberse a que el plomo por ser un metal pesado, estaría produciendo daño oxidativo, generando radicales libres de oxígeno, y para contrarrestar este estrés, las células expresarían constitutivamente enzimas que las desintoxican de las especies activas de oxigeno y reparan el daño causada por éstas (Martínez, 2003). Este comportamiento ha sido observado en otras plantas sometidas a condiciones similares, como *Dalia* sp., *Tagetes erecta* L y *Cosmos bipinnatus,* en las cuales la actividad de peroxidasas tiende a aumentar significativamente con el incremento en la concentración de residuos de minas, sugiriendo que la presencia de peroxidasas en las hojas cotiledonares y verdaderas, puede estar involucrada en la eliminación de especies reactivas de oxígeno que se generan por la presencia de los elementos potencialmente tóxicos (Rodríguez *et al.*, 2006). En plantas de *Cucurbita pepo* L. Courgetted'Alger tratadas con Cd, Cu y Zn, se observó que el tratamiento con cada metal pesado ocasionó un incremento de la actividad de peroxidasas



(P<0,05)

Fig. 1. Variación de la actividad de Peroxidasas Solubles en hojas de *Medicago sativa* L. "alfalfa" a los 10 y 20 días de tratamiento con plomo. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias debidas al tratamiento según Tukey HSD (n=3).

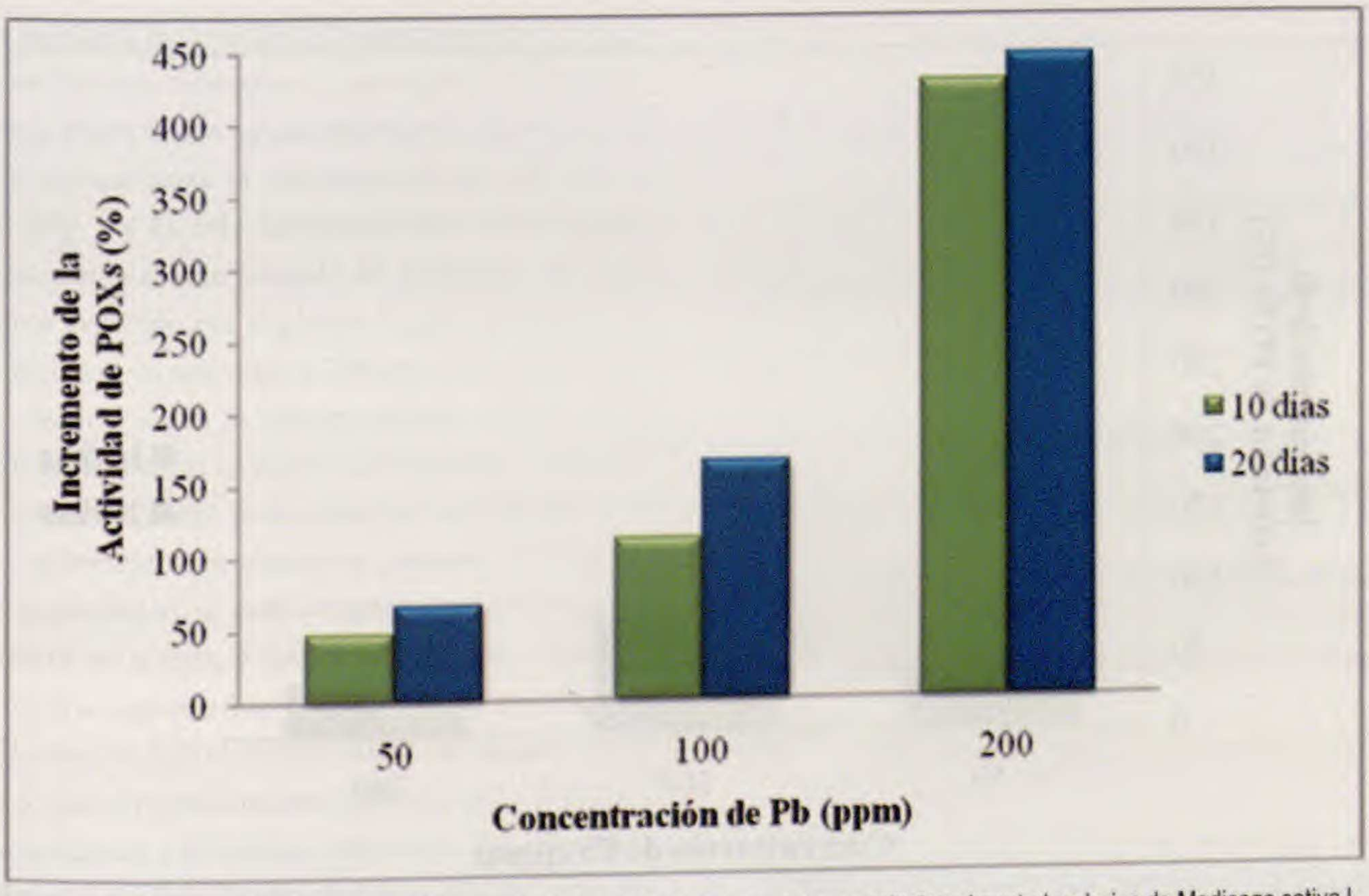
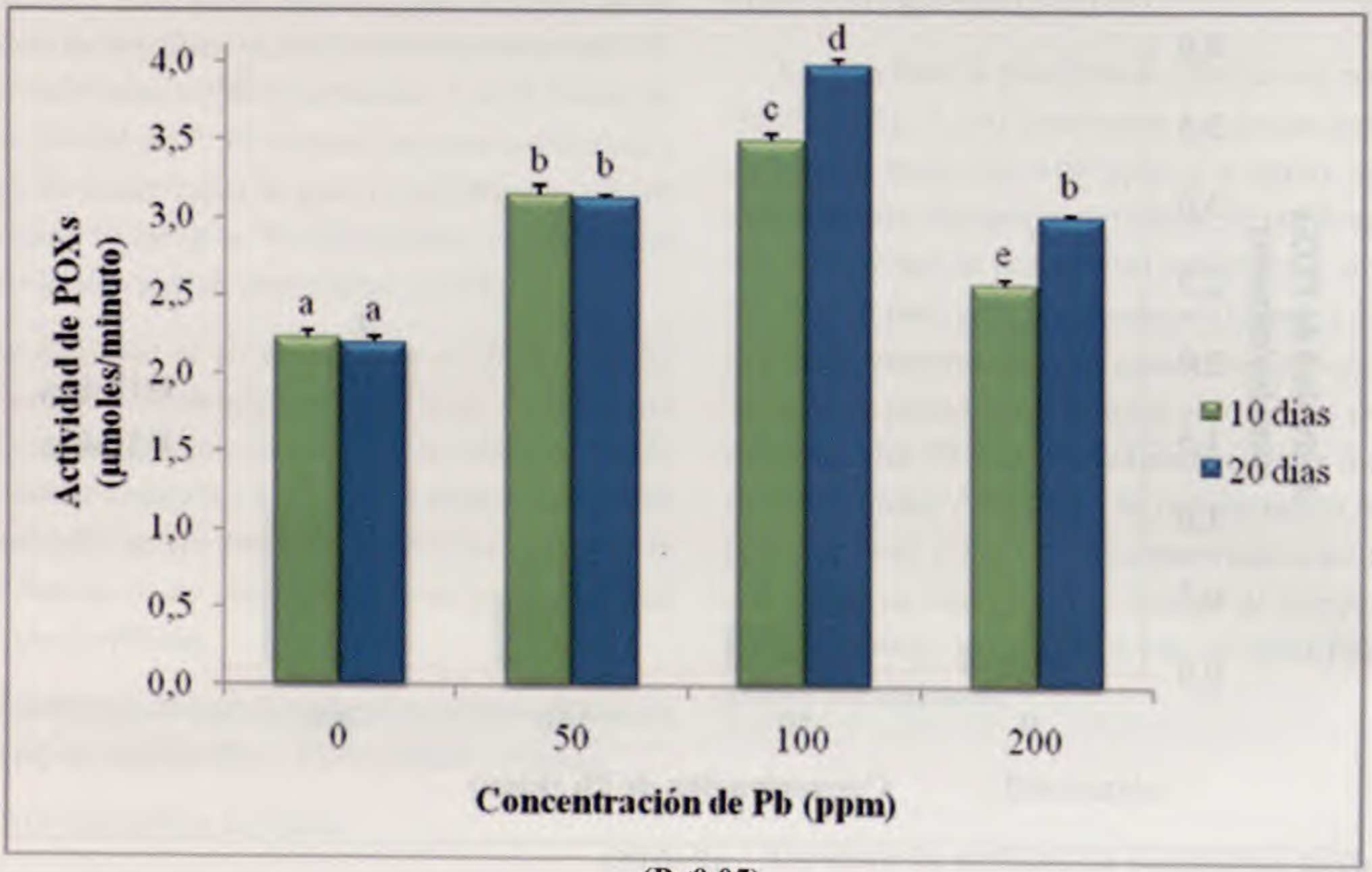


Fig. 2. Aumento de la actividad de peroxidasas solubles indicada en porcentaje con relacion al control en hojas de Medicago sativa L. "alfalfa", expuestas a diferentes concentraciones de plomo durante 10 y 20 días.



(P<0,05)

Fig. 3: Variación de la actividad de Peroxidasas Solubles en raíces de *Medicago sativa* L. "alfalfa" a los 10 y 20 días de tratamiento con plomo. Las barras verticales indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias debidas al tratamiento según Tukey HSD (n=3).

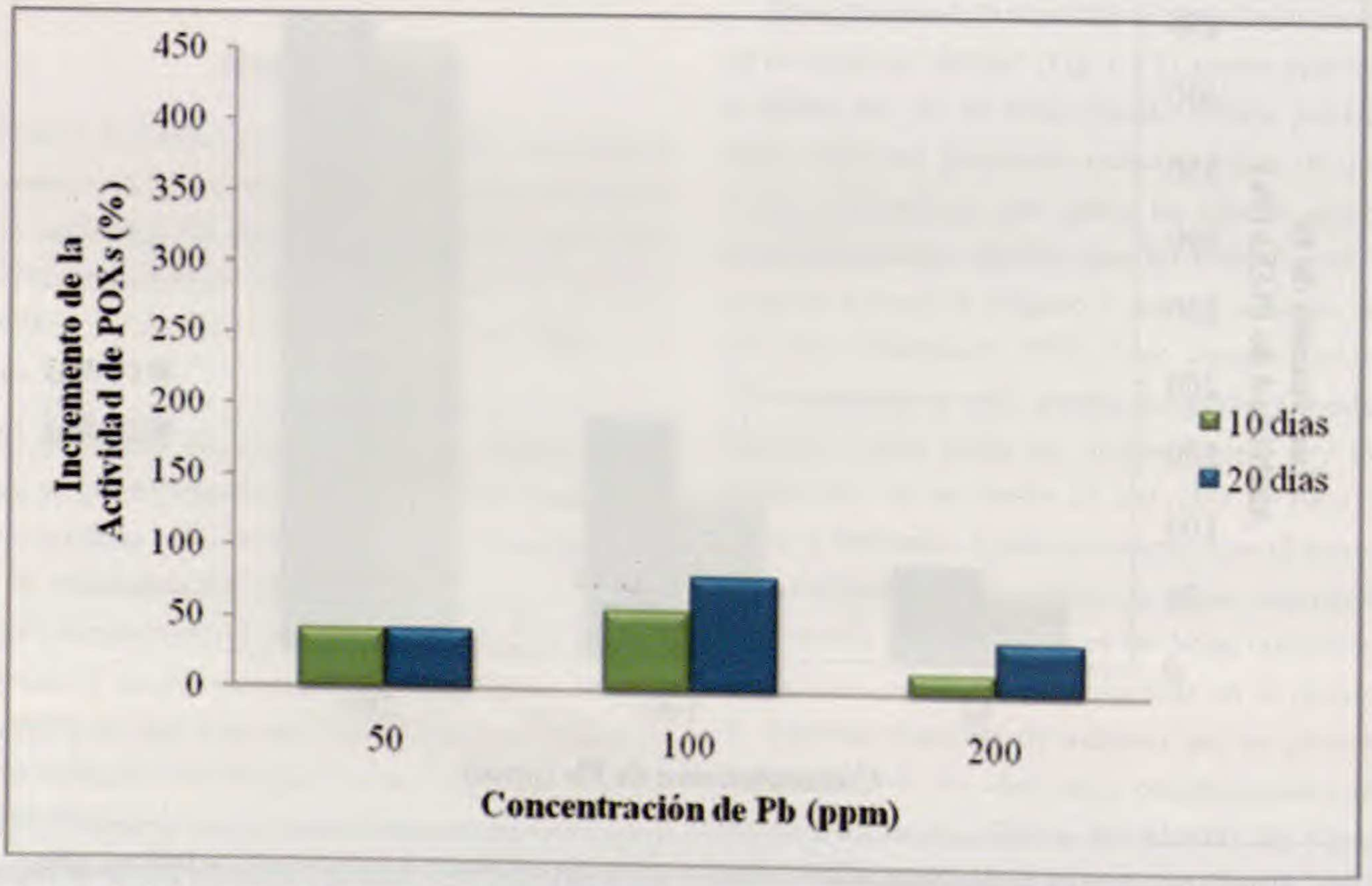


Fig. 4: Aumento de la actividad de Peroxidasas Solubles indicada en porcentaje, con relación al control en raíces de *Medicago sativa* L. "alfalfa", expuestas a diferentes concentraciones de plomo durante 10 y 20 días.

(Tahlil *et al.*, 1999). Así también, se ha reportado que el estrés crónico por metales pesados induce en el alga Enteromorpha compressa un aumento en la actividad de ascorbatoperoxidasa (Ratk evicius & Moenne, 2002). Al respecto, algunos investigadores afirman que las plantas sometidas a condiciones ambientales adversas, pueden desarrollar sistemas de defensa para contrarrestar estos factores, deteniendo o minimizando ciertas funciones vitales para potenciar otras (Mujica *et al.*, 2005).

La disminución de la actividad de peroxidasas en hojas de "alfalfa" por el tiempo (Fig. 1), no estaría condicionada por la concentración de plomo, debido a que también se observa disminución de la actividad de peroxidasas solubles en el control (0 ppm) a los 20 días, respecto al control a los 10 días. Al respecto, se ha reportado que la actividad de las peroxidasas puede estar asociada a la edad ontogénica de las plantas, ya que presentan mayores valores en hojas jóvenes respecto a hojas adultas. Más aún, cuando se somete el material adulto a tratamientos de rejuvenecimiento, los niveles de peroxidasas también aumentan (Figueroa &Schugurensky, 2002).

Por otro lado, la variación de la actividad de peroxidasas en raíces fue muy diferente a la presentada en hojas. Así, podemos observar que hay un incremento de la actividad de esta enzima hasta la concentración de 100 ppm de plomo (Fig. 3 y 4), este comportamiento podría deberse a que la planta estaría tratando de protegerse del estrés oxidativo generado por el plomo. Luego se observa una disminución de la actividad a 200 ppm de plomo, lo que podría deberse según lo refieren algunos autores, a que las plantas sembradas en suelos contaminados con plomo, almacenan este metal principalmente sus en raíces, así en su experimento con plantas de guisante cultivadas en medio hidropónico, se pudo observar que un 70% del Pb se localizó en la raíz, y que la presencia de este metal disminuyó la capacidad de los mecanismos antioxidantes para eliminar el H2O2 (Naya, 2007). Al respecto, se ha señalado que el mecanismo mediante el cual las plantas de alfalfa remueven y acumulan cobre desde las soluciones, comienza a perder efectividad después de un cierto tiempo, en ese caso 10 días, lo que posiblemente esté relacionado con la capacidad que tienen las plantas para soportar elementos tóxicos en sus organismos sin sufrir daños serios (Mujica *et al.*, 2005). Así mismo, según el estrés oxidativo es atribuible a una disminución de las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) (Iturbe,1996).

Con respecto al tiempo en raíces (Fig. 3), observamos que a la concentración de 50 ppm de plomo, la actividad de peroxidasas tiene un comportamiento parecido al del testigo, es decir la actividad a los 10 y 20 días fue similar, mientras que hubo un aumento de la actividad a las concentraciones de 100 y 200 ppm de plomo a los 20 días, observando mayores diferencias a 200 ppm de plomo; esto podría ser resultado de que las plantas que sobrevivieron estarían recuperándose de los daños causados al ser sometidas a concentraciones tan altas de plomo, por lo que la actividad peroxidasa aumentó. Además, según algunas investigaciones, las plantas que acumulan plomo utilizan más energía en los mecanismos necesarios para adaptarse a las altas concentraciones de metal en sus tejidos (Naya, 2007).

Conclusiones

La actividad de las peroxidasas solubles en hojas de *Medicago sativa* L. "alfalfa" aumentó al incrementarse la concentración de plomo en el medio de cultivo, tanto a los 10 como a los 20 días, observándose los mayores valores a los 10 días. En raíces, se encontró un aumento de la actividad de las peroxidasas solubles, pero se observó variación en dicha actividad con respecto al tiempo y a la concentración de plomo en el medio.

Literatura citada

Albert, L.A. 1997. Curso básico de toxicología ambiental. Segunda edición. Ediciones Utheha. México.

Armas, C. & R. Armas.2002. Tecnología ambiental: en nuestro hogar la nave sideral tierra. Primera edición. Editorial ApliGraf S.R.L. Trujillo-Perú.

Azcón-Bieto, J. & M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill. Interamericana. EdicionsUniversitat. Barcelona. Madrid.

Baquero, L; Castro, J. & C. Narváez. 2005. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. Acta Biológica Colombiana. 10 (2): 49-59.

Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta. 212 (4): 475-86.

ChaiTsun-Thai, Nor'Aini M. Fadzillah; M. Kusnan & M. Mahmood. 2005. Efecto del estrés oxidativo sobre los cultivares 'Berangan' y 'Mas'. InfoMusa. 14 (2): 32-36.

Fuentes, L. Y.; A. Pérez; Domínguez, M. & A.R. González . 2008. Influencia del NaCl en indicadores bioquímicos evaluados en callos de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. Pastos y Forrajes. 31 (1): 35-46.

Dammert, A. & F. Molinelli. 2007.Panorama de la minería en el Perú. OSINERGMIN.3-200 p.

Donald, F. & J.R. Cipollini. 1998.The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. American Journal of Botany 85(11): 1586–1591.

Figueroa, R.M. & A. Schugurensky. 2002. Identificación isoenzimática de portainjertos de palto (*Persea americana* Mill.). Agro sur. 30 (2): 1-6.

Iturbe, O.V.1996. Sistemas antioxidantes en plantas de guisante sometidas a estrés ambiental. Tesis doctoral. Departamento de bioquimica y biologia molecular y celular. Universidad Zaragoza.

Martínez, M. L. 2003. Respuesta bioquímica y molecular de la simbiosis *Phaseolus vulgaris* – Glomusintraradices al estrés de agua. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. México.

Mellanby, K. 1977. Biología de la polución. Primera edición. Ediciones omega S. A. Barcelona.

Mujica, E.; C. Ortiz; J. Li Kao & O. Pavez1. 2005. Uso de especies vegetales para remover cobre desde efluentes contaminados mediante rizofiltracion. Proceedings of the VI international conference on clean technologies for the mining industry, University of Concepción, Chile.

Naya, A. L. 2007. Respuesta fisiológica, bioquímica y molecular de las leguminosas a estreses abióticos. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de Nutrición Vegetal. Estación Experimental de Aula Dei Zaragoza.

Nuñez, J. 2005. Bioacumulación de plomo en *Amaranthus caudatus* L. "kiwicha" en condiciones de laboratorio. Tesis. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.

Pagliaricci, H. R. & T. W. Pereyra. 2006. Nota técnica: producción y distribución de forraje de alfalfa (*Medicago sativa* L.) intersembrada con cereales forrajeros de invierno. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 14 (4): 115-119.

Puga, S M.; T. Sosa, C. Lebgue, Quintana & Campos. A. 2006. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. Ecología Aplicada. 5(1,2): 149-155.

Ratkevicius, N. & A. Moenne. 2002. Detección de enzimas y compuestos antioxidantes en la macroalga verde *Enteromorpha compressa* colectada en sitios contaminados con metales pesados del norte de chile. Biological Research. 35 (3-4).

Rodríguez,E.; A. Delgado; Ch. González; G. Carrillo; M. Mejía & H. Vargas. 2006. Efectos de EPTS en la germinación y establecimiento de plantas ornamentales crecidas en suelo con residuos de minas. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Truelove, B.; R. Rodriguez-Kabana,& L.R. Jones. 2003. Changes in the peroxidase activity of subcellular fractions from aging *Phaseolus* hypocotyls.Canadian Journal of Botany. 53(9): 852-860.

Tahlil, N.; A. Rada; J.L. Baaziz. ; Morel, M. El Meray & M. El Aatmani 1999. Quantitative and qualitative changes in peroxidase of *Cucurbita pepo* cultivars stressed with heavy metals. BiologiaPlantarum. 42 (1): 75-80.

Vázquez, A.A.; C.L. Justin; G.C. Siebe; G.G Alcántar.; D. M. De Bauer 2001. Cadmio, níquel y plomo en agua residual, suelo y cultivos en el valle de Mezquital, Hidalgo, México. Agrociencia. 35 (3): 267-274.

Villegas, A.Y.; G.A. Hernández; P.J. Pérez; C.C. López; H.J. Herrera; Q,J. Enríquez & C.F. Gómez 2004. Patrones estacionales de crecimiento de dos variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L.). Téc PecuMéx. 42(2): 145-158.